Eliane Sophie Hesse
Dr. sc. hum.

Der Einfluss von modularen starPEG Hydrogelen auf die Produktion von stabiler, hyaliner Knorpelmatrix *in vitro* und *in vivo*

Fach/Einrichtung: Orthopädie
Doktormutter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter

Die Heilung von Knorpeldefekten mit zellbasierten Therapien ist bis heute eine große Herausforderung, da isolierte Chondrozyten während der Expansion dedifferenzieren und mesenchymale Stromazellen ohne einen entsprechenden Wachstumsfaktor nicht in der Lage sind zu Chondrozyten zu differenzieren. Tissue Engineering Ansätze ermöglichen zwar die Redifferenzierung von Chondrozyten, jedoch konnte in vielversprechenden modulierbaren PEG-Hydrogelen bislang die perizelluläre Matrixablagerung nicht überwunden werden. Die Verwendung von mesenchymalen Stromazellen steht hingegen vor dem Problem, dass die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen zwar mit TGF-β induziert werden kann, jedoch auch deren Hypertrophie dabei gefördert wird. Bislang ist es nicht gelungen die hypertrophe Entwicklung von mesenchymalen Stromazellen zu unterbinden, ohne dabei die Chondrogenese negativ zu beeinflussen. Zudem ist meist eine langwierige Vorkultivierung erforderlich, sodass die Behandlungsdauer unnötig verlängert wird.
Ziel dieser Arbeit war es daher, die perizelluläre Matrixablagerung von Chondrozyten in einem PEG-Hydrogel zu überwinden und darüber hinaus die Chondrogenese von mesenchymalen Stromazellen ohne die bislang unweigerliche Hypertrophie und Mineralisierung zu ermöglichen. Zudem sollte mit lokaler TGF-β-Gabe die direkte Chondrogenese von mesenchymalen Stromazellen *in vivo* eingeleitet werden, wodurch eine Vorkultivierung der Konstrukte nicht mehr überflüssig würde.
Dazu wurde ein neuartiges modulares heparinhaltiges Hydrogelsystem PEG-H verwendet, das in seiner Zusammensetzung den Gegebenheiten der Zellen angepasst werden kann. Dahingehend wurde mit zellinstruktiven Peptiden die Spaltbarkeit des Hydrogels (MMP-spaltbare Linker), die Zellmorphologie (RGD) und die Retention von Kollagenen (CKLER und CWYRGRL) entsprechend moduliert und die geeignetste Zusammensetzung für Chondrozyten und mesenchymale Stromazellen die Matrixablagerung *in vitro* und *in vivo* ermittelt. Des Weiteren wurden TGF-β-augmentierte PEG-Hydrogele in subkutane Taschen

von immundefizienten Mäusen implantiert und die direkte Chondrogenese der mesenchymalen Stromazellen in Abhängigkeit des Sulfatgehaltes von Heparin mittels 6O/N-desulfatierter PEG-DH und heparinfreier PEG Hydrogele untersucht.

Die Modulation des Hydrogels ergab für die Chondrozyten eine stärkere Matrixablagerung durch die Erhöhung der Spaltbarkeit und darüber hinaus eine ausgestreckte Zellmorphologie und dadurch verbesserte Matrixverteilung mit dem Einsatz von RGD *in vitro* und *in vivo*. Die mesenchymalen Stromazellen profitierten durch eine erhöhte Spaltbarkeit von einer gesteigerten Zellviabilität, Proliferation und Matrixablagerung, jedoch konnte die Verwendung weiterer zellinstruktiver Peptide dies nicht weiter verbessern. Die kollagenbindenden Peptide konnten jedoch weder bei Chondrozyten noch bei mesenchymalen Stromazellen zu einer verstärkten Kollagenretention beitragen. Durch die lokale TGF-β-Gabe und dessen starke Retention in PEG-H war es möglich die Chondrogenese der mesenchymalen Stromazellen ohne Vorkultivierung *in vivo* einzuleiten und dabei die Hypertrophie und Mineralisierung bis zu acht Wochen zu unterdrücken. Durch die Verwendung der PEG-DH und PEG Hydrogele konnte die Bedeutsamkeit der 6O/N-Sulfatgruppen von Heparin bestätigt werden, da in deren Abwesenheit die endochondrale Differenzierung und Mineralisierung in PEG-DH und PEG angeregt wurde.

In dieser Arbeit konnte erstmalig die Anwendung von RGD und der positive Einfluss der ausgestreckten Chondrozyten auf die Matrixverteilung *in vivo* gezeigt werden, indem die perizelluläre Matrixablagerung der Chondrozyten überwunden und eine konstruktfüllende Ablagerung von Kollagen Typ II beobachtet werden konnte.

Zudem wurde zum ersten Mal die Chondrogenese von mesenchymalen Stromazellen in diesem modularen Hydrogelsystem ermöglicht und durch lokale TGF-β-Gabe die direkte Chondrogenese *in vivo* eingeleitet. Des Weiteren ist es in dieser Arbeit erstmalig gelungen, die Hypertrophie und Mineralisierung von chondrogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen *in vivo* zu unterbinden und eine stabile, hyaline Knorpelmatrix zu produzieren.

Diese Arbeit lieferte einen entscheidenden Beitrag bei der bislang vorherrschenden Problematik der perizellulären Matrixablagerung von Chondrozyten in PEG-Hydrogelen und der hypertrophen Entwicklung der mesenchymalen Stromazellen während der Chondrogenese. Die Überwindung beider dieser Probleme trägt dazu bei, dass zellbasierte Therapien im Patienten künftig vereinfacht und verbessert werden könnten, sodass eine schnelle und vollständige Regeneration von Knorpeldefekten möglich wäre.